

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологий

Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ В.А. Кратасюк

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ г

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА**

06.03.01 БИОЛОГИЯ

06.03.01.07 БИОФИЗИКА

Патологические изменения в синапсах клеток Пуркинье мозжечка на ранних  
стадиях астроглиоза

Научный руководитель

к.ф.-м.н. А.Н. Шуваев

\_\_\_\_\_

Научный консультант

к.м.н. А.Н. Шуваев

\_\_\_\_\_

Студент ББ14-01Б, 041401997

Д.А. Яковлева

\_\_\_\_\_

Красноярск 2018

## Реферат

Выпускная квалификационная работа на тему «Патологические изменения в синапсах клеток Пуркинье мозжечка на ранних стадиях астроглиоза» содержит 24 страницы текстового документа, 14 использованных источников, 6 листов графического материала.

КЛЕТКИ ПУРКИНЬЕ, АСТРОЦИТЫ, МОЗЖЕЧОК, ГЛИЯ БЕРГМАНА, АСТРОГЛИОЗ, НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИЯ, ЭКСАЙТОТОКСИЧНОСТЬ.

Цель работы: Открытие новых патологических механизмов на ранних стадиях астроглиоза мозжечка. Исходя из цели работы были поставлены следующие задачи:

- Экспрессия оптогенетических конструкций, селективных для астроцитов, в мозжечке мышей *in vivo*
- Изучение транссинаптической передачи импульса клеток Пуркинье при острой активации глии Бергмана
- Разработка модели хронического астроглиоза
- Изучение транссинаптической передачи импульса клеток Пуркинье при хронической активации глии Бергмана (в модели ранней стадии астроглиоза)

В результате исследования было выявлено, что у мышей, инъецированных PBS и AVV GFAP-ChR2-mKate2 без фотостимуляции усреднённые ёмкости клеток Пуркинье мозжечка статистически не различались. Сопротивление мембраны также достоверно не различалось. Фотостимуляция астроцитов в срезах мозжечка, экспрессирующих ChR2-mKate2 серией световых импульсов приводила к активации глии Бергмана, что влияло на передачу нервного импульса в виде уменьшения  $\tau$  и амплитуды ПВ-ВПСТ. Непосредственно сразу после фотостимуляции  $\tau$  ПВ-ВПСТ клеток Пуркинье в мозжечке животных инъецированных GFAP-ChR2-mKate2 от контрольных значений до фотостимуляции статистически значимо различалось. Блокада обратного захвата глутамата (500nM TBOA) увеличивала  $\tau$  и амплитуду ПВ-ВПСТ. На фоне TBOA фотостимуляция не изменяла  $\tau$ . В отдельной группе животных, астроциты, экспрессирующие ChR2-mKate, стимулировали *in vivo* в течении 4 дней повторными сериями импульсов в течение 60 секунд с последующим 60 секундным перерывом. Фотостимуляция осуществлялась посредством светодиода, фиксированного над зоной инъекции к костям черепа мыши. В срезах из этих животных фотостимуляция астроцитов вызывала повышение, а не понижение  $\tau$ , тогда

как амплитуда ПВ-ВПСТ не изменялась. Хроническая фотостимуляция астроцитов вызывала уменьшение ёмкости клеток Пуркинье. Это, скорее всего, указывает на уменьшение поверхности мембраны этих нейронов и их общего размера.

Полученные данные позволяют предположить, что снижение обратного захвата глутамата может вести к токсическому влиянию глутамата на клетки Пуркинье.

## Содержание

Введение. ....	4
1 Материалы и методы. ....	6
1.1 Нарботка и очистка оптогенетических вирусов. ....	6
1.2 Введение оптогенетических вирусов in vivo. ....	7
1.3 Получение живых срезов. ....	7
1.4 Фотоактивация астроцитов, экспрессирующих GFAP-ChR2-mKate. ....	7
1.5 Регистрация токов с помощью метода локальной фиксации потенциала. ....	8
1.6 ИГХ срезов мозжечка. ....	8
1.7 Статистический анализ. ....	8
2 Литературный обзор. ....	9
2.1 Функциональная анатомия мозжечка. ....	9
2.2 АМРА опосредованный ВПСТ. ....	10
2.3 Астроглия. ....	10
2.4 Астроглиоз. ....	12
2.5 Вклад ЕААТ в эксайтотоксичность при нейродегенеративных заболеваниях. ....	13
3 Результаты. ....	15
3.1 Острая фотостимуляция астроцитов. ....	15
3.2 Синаптическая пластичность, индуцированная активацией NMDA рецепторов. ....	17
3.3 Острая и хроническая фотостимуляция. ....	18
3.4 Изменение морфологии клеток после острой и хронической фотостимуляции. ....	19
3.5 Хроническая фотостимуляция астроцитов. ....	20
Выводы. ....	21
Список сокращений. ....	22
Список литературы. ....	23

## Введение

Цель настоящей работы состояла в том, чтобы с помощью оптогенетики, создать модель селективного астроглиоза мозжечка и изучить влияние реактивной глии Бергмана на функцию нейронов, в первую очередь, клеток Пуркинье [1]. В качестве модели использовали мышей линии CD-1. С этой целью интракортикально в кору область червя мозжечка стереотаксически было введено по 10μл раствора, содержащего частицы аденовирусного вектора AVV GFAP-ChR2-mKate2 [2]. В качестве контроля инъецировали 10μл натрий-фосфатного буфера (PBS). Через 4 дня мышь декапетировали и изучали экспрессию трансгенного белка mKate, ёмкость, сопротивление мембраны и синаптическую передачу в клетках Пуркинье [3]. При стимуляции параллельных волокон записывали постсинаптические токи в клетках Пуркинье (ПВ-ВПСТ). Используя программу «ClampFit», рассчитывали константу ( $\tau$ ) времени спада ПВ-ВПСТ при аппроксимации экспоненты кривой с помощью уравнения Чебышёва.

Нейродегенеративные заболевания являются наиболее актуальной проблемой в медицине и нейробиологии XXI века. Наибольший вклад в гибель нейронов при данном состоянии вносит такой патологический процесс, как эксайтотоксичность, поэтому исследование молекулярных основ данного процесса является наипервейшей задачей современной нейробиологии. Основным игроком в развитии эксайтотоксичности является астроглия, которая, захватывая нейромедиатор из синаптической щели, препятствует развитию эксайтотоксичности. Это явление очень динамично и не может адекватно быть исследовано с помощью иммуногистохимических и генетических методов исследования, связанных с исследованием фиксированного материала. В связи с этим, в данной работе были применены методики исследования живых клеток, такие как локальная фиксация потенциала мембраны и оптогенетика.

Как человеческая кожа является «зеркалом» процессов, происходящих внутри организма, так и мембрана клетки отражает процессы ее внутренней жизнедеятельности, в частности, изменением электрической активности. Регистрировать же электрическую активность нейронов возможно методом локальной фиксации мембранного потенциала, который впервые был использован Неером и Сакманом в 1976г. Данный метод позволяет регистрировать изменения потенциала и токов на мембране клетки через контакт между кончиком микроэлектрода и мембраной клетки, имеющей высокое сопротивление. Термин «patch clamp» означает изолированный участок, возникающий за счет контакта стеклянного микроэлектрода и

участка клеточной мембраны, на котором и осуществляются исследования ионных токов и изменение потенциала. По изменению данных характеристик можно оценить не только работу нейронов, но и косвенно других составляющих синапса, таких как астроциты.

С помощью этого метода можно:

1. проводить многие исследования в рамках классических электрофизиологических подходов;
2. регистрировать токи и потенциалы от клеток очень малых размеров (3-10 мкм);
3. регистрировать токи одиночных каналов амплитудой порядка пикоампер;
4. исследовать действие лекарственных препаратов при быстром подведении их как к наружной, так и к внутренней стороне мембраны.

Метод оптогенетики разработан для селективного управления жизнедеятельностью отдельных клеток с помощью света. Суть оптогенетических подходов состоит в управляемом изменении мембранного потенциала клеток путем активации светом внедренных в их мембрану светочувствительных ионных каналов. Оптогенетика использует методы генной инженерии для внедрения в клеточную мембрану исследуемых нейронов белков, опсинов, способных менять мембранный потенциал клетки в ответ на активацию светом определенной длины волны. Среди опсинов выделяют активаторы, деполяризующие мембрану, и ингибиторы, гиперполяризующие ее. Эти генетические инструменты могут использоваться как по отдельности, так и в сочетании. Наиболее часто используются родопсины. Эти белки имеют в своей структуре семь трансмембранных доменов, образующих канал. Они сопряжены с ретиналем, являющимся кофактором этих опсинов. Поглощая фотон, ретиналь изомеризуется, провоцируя изменение конформации белка, что приводит к изменению проницаемости мембраны для ионов, индуцируя ток одновалентных ( $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ) и небольшого количества некоторых двухвалентных ( $Ca^{2+}$ ) катионов, вызывающих деполяризацию мембраны нейрона. Каналородопсин-2 (ChR2) был первым бактериальным белком, использованным для изменения активности нейрона, а именно его деполяризации. Спектр поглощения ChR2 находится между 350 и 530 нм, тогда как максимальная активация достигается при стимуляции светом с длиной волны около 460 нм (синий свет). После того как канал открывается, он может медленно спонтанно закрываться в темноте, но его закрытие так же может быть индуцировано зеленым светом. Скорость тока ионов через этот канал сравнительно мала (1,21 мс при освещении 20 мВт/мм<sup>2</sup>), поэтому для достижения функционально значимого результата требуется присутствие

большого количества каналов на мембране. Сейчас получены каналы с большей светочувствительностью и скоростью тока ионов, но и в настоящее время ChR2 является наиболее используемым в оптогенетических исследованиях. Астроциты подвергались геномодификации с помощью оптогенетических вирусов, селективно экспрессирующих светочувствительные неселективные ионные каналы, что приводило к их избирательной активации при фотостимуляции голубым светом  $\lambda = 480\text{ нм}$ . ChR2 реагирует на облучение светом. Происходит повышение  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  токов [4]. Применяемые нами оптогенетические аденовирусы селективно экспрессировались в астроцитах, что позволило изучить их влияние на клетки Пуркинье мозжечка мышей.

Сочетание метода локальной фиксации потенциала мембраны и оптогенетики позволило разработать модель селективного астроглиоза и выявить критические молекулы-мишени в развитии эксайтотоксичности. Данные, полученные нами, лягут в основу для разработки новых молекулярных методов лечения различных нейродегенеративных заболеваний не только мозжечка, но и большого мозга.

### **Актуальность**

- Реактивный астроглиоз возникает при нейродегенерации, ишемии, черепно-мозговой травме и затрудняет выполнение функций нейронов головного мозга
- Метод оптогенетики позволяет создать селективную модель астроглиоза и изучить патогенез на любой стадии
- Выявление молекул маркеров на ранней стадии астроглиоза позволяет создать эффективную терапию данного состояния

## **1 Материалы и методы**

### **1.1 Нарботка и очистка оптогенетических вирусов:**

Для амплификации аденовируса GFAP-ChR2-mKate использовали НЕК 293. Клетки инкубировали при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 2-3 дней до полного цитопатического эффекта (CPE). Когда CPE было завершено, клетки собирали и вирусные частицы высвобождались клеточной криодеструкцией. Вирусную очистку проводили с использованием набора для аденовирусной очистки «Viabind» (Cell Biolabs, US). Вирус аликвотировали в 20 мкл и хранили при -80 °C. Для экспрессии белка ChR2 высокого уровня в клетках-мишенях мы использовали AVV с сильным промотором (GFAP). После выше

описанных процедур – концентрация вируса достигала  $3,4 \times 10^5$  единиц на 1 мл.

## **1.2 Введение оптогенетических вирусов in vivo:**

До введения вируса внутривентриально вводился Маннитол (25% р-р 30µл/мг) для дегидратации и увеличения ёмкости внутримозговой полости. Десять микролитров аденовирусного векторного раствора вводили в субарахноидальное пространство над червем мозжечка (около дольки VI) 3-месячных (P90) WT CD11 мышей (Torashima et al., 2006), обезболивавших хлоралгидратом [300 мг / кг массы тела]. Большинство трансдуцированных клеток были ограничены астроцитами под контролем промотора GFAP. Для создания модели астроглиоза мозжечка на кости черепа устанавливался светодиод, который производил хроническую фотостимуляцию (протокол фотостимуляции см. ниже) инфицированной зоны мозжечка в течение 4 дней.

## **1.3 Получение живых срезов:**

Декапитация мыши осуществлялась под хлоралгидратным наркозом (300 мг/кг веса животного). Мозг быстро вынимался из черепной коробки и погружался на 1 минуту в охлажденный (до 4°C) раствор Рингера, содержащий (в mM): 234 сахарозы; 26 NaHCO<sub>3</sub>; 2,5 KCl; 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 11 глюкоза; 10 MgSO<sub>4</sub> и 0,5 CaCl<sub>2</sub> 0,5, pH 7,4 и перфузирующийся 95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>. Парасагиттальные срезы червя мозжечка нарезались толщиной 250 мкм, используя вибротом. Срезы помещались во внеклеточный раствор, содержащий (в mM): 125 NaCl, 2,5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 10 D-глюкоза и 0,1 пикртоксин. Этот раствор непрерывно перфузировался смесью 95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub> при комнатной температуре в течение 45 мин перед началом записи.

## **1.4 Фотоактивация астроцитов, экспрессирующих GFAP-ChR2-mKate:**

Клетки, экспрессирующие GFAP-ChR2-mKate, избирательно обнаруживали с помощью флуоресценции красного белка mKate. Активация оптогенетической конструкции была достигнута при умеренной интенсивности синего света (диод с  $\lambda=480$  нм). Светодиод LedBlue управлялся усилителем ЕРС 10 (НЕКА, Германия), который позволял нам стимулировать астроциты вспышками света (20/20 мс) в течение 60 с. Регистрация ответов с активированных астроцитов проводилась методом локальной фиксации мембранного потенциала.



### **1.5 Регистрация токов с помощью метода локальной фиксации потенциала:**

Записи whole-cell voltage-clamp были сделаны с использованием внутриклеточного раствора, содержащего (в миллимолярах) 65 К-глюконат, 65 Cs-methanesulfonate, 10 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 4Na<sub>2</sub>ATP, 1 NaGTP, 20 HEPES, 0,4 EGTA и 5 сахарозы (pH 7,3, С помощью CsOH). Фиксировали напряжение на -70 мВ для регистрации токов с параллельных волокон (PF) EPSC (возбуждающие постсинаптические токи). Селективная стимуляция PF была подтверждена парным импульсом уменьшения амплитуд EPSC с интерстимулятивным интервалом 50 мс. Пассивные мембранные свойства, такие как мембранная емкость (C<sub>m</sub>) и мембранное сопротивление (R<sub>m</sub>), были получены путем применения гиперполяризующих этапов напряжения от -70 до -80 мВ в течение 500 мс. PF-возбуждающие постсинаптические токи (ВПСТ) регистрировались с напряжением при -70 мВ при электростимуляции. Константы времени затухания для ПВ ВПСТ измеряли путем подгонки ВПСТ-распада с помощью одной экспоненты. Долговременная регистрация ПВ-ВПСТ производилась до (контроль) и после фотостимуляции в течение 10 минут. Протокол фотостимуляции см. выше. Сравнение усреднённых амплитуд ВПСТ и времени спада амплитуд после фотостимуляции проводилось по отношению к контрольным показателям ВПСТ до фотостимуляции в процентном соотношении. Контрольные показатели принимались за 100%.

### **1.6 ИГХ срезов мозжечка:**

Для ИГХ исследования использовались фиксированные срезы мозжечка толщиной 250 мкм после электрофизиологических исследований. Эти срезы пермеабелизовали и блокировали PBS, содержащим 2% normal donkey serum, 0,1% Triton X-100 и 0,05% NaN<sub>3</sub> (блокирующий раствор) и обрабатывали в течение ночи следующими антителами: chicken polyclonal anti-GFAP (1: 1000, Frontier Institute, Ишикари, Япония), в блокирующем растворе. После промывания (4 раза) 0,1% Triton X-100 (промывочный раствор) при комнатной температуре в PBS, срезы обрабатывали вторичными антителами в блокирующем растворе. Каждый экземпляр наблюдался при перевернутом конфокальном лазерно-сканирующем микроскопе (Olympus).

### **1.7 Статистический анализ:**

Все получаемые результаты с нескольких клеток усреднялись и статистически обрабатывались. Результаты выражаются как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Статистический анализ различий

был определен непарным t-критерием Стьюдента, точным тестом Фишера, дисперсионным анализом. Различия считались значимыми, если  $P < 0,05$ .

## **2 Литературный обзор**

### **2.1 Функциональная анатомия мозжечка:**

Строение коры мозжечка преимущественно стереотипно. Самый поверхностный из трех слоев коры (молекулярный слой) отделен от нижнего (гранулярного) слоя слоем клеток Пуркинье.

В различных слоях коры мозжечка расположены шесть разных типов нервных клеток и их отростки. Мелкие клетки-зерна расположены в зернистом слое, а аксоны их идут в молекулярный слой. Здесь эти аксоны Т-образно делятся, посылая в каждом направлении вдоль поверхности коры ветвь (параллельное волокно). Преодолевая большие расстояния, эти параллельные волокна пересекают ветвления дендритов многих клеток Пуркинье и образуют с ними и дендритами корзинчатых и звёздчатых нейронов синапсы. Таким образом, нейроны клеток-зёрен передают, используя в виде нейромедиатора глутамат, полученное ими от моховидных волокон возбуждение, на значительное расстояние грушевидным клеткам Пуркинье. В зернистом слое расположены также более крупные клетки Гольджи.

Между этими двумя слоями лежит слой клеток Пуркинье. Эти клетки представляют собой крупные нейроны; их дендриты широко ветвятся в молекулярном слое. Аксоны клеток Пуркинье спускаются к ядрам мозжечка, и небольшое их количество заканчивается на вестибулярных ядрах.

В кору мозжечка входят два типа двигательных волокон. Лазающие (лиановидные) волокна проходят через зернистый слой и заканчиваются в молекулярном слое на дендритах клеток Пуркинье. Отростки лиановидных волокон оплетают дендриты этих клеток. К каждой клетке Пуркинье подходит лишь одно волокно, тогда как каждое лиановидное волокно иннервирует 10-15 нейронов Пуркинье.

Информация поступает в мозжечок из коры больших полушарий, ствола мозга и спинного мозга. Спинной мозг передает сведения о положении конечностей, туловища, головы, шеи и глаз. Всю эту информацию интегрируют клетки Пуркинье. Эти нейроны дают разряды очень частых импульсов и большую часть времени находятся в активном состоянии, что, по-видимому, свидетельствует об их постоянном контроле над положением туловища, конечностей и головы. Нейроны Пуркинье в свою очередь посылают информацию крупным нейронам глубоких ядер

мозжечка. Информация, которую выдают эти ядра, видоизменяет активность нейронов моторной коры [5].

Несмотря на изящную регулярную структуру мозжечка и хорошо изученные нейронные сети, конкретная роль его в двигательной функции еще далеко не ясна. Известно, что при осуществлении более тонких движений мозжечок определяет, где находится в каждый данный момент части тела, и сравнивает их действительное положение с тем, которое должно быть. Похоже, что мозжечок располагает копией той программы движения, которой руководствуются нейроны двигательной коры. Мозжечок согласовывает активность моторной коры и спинного мозга, обеспечивая более «гладкое» выполнение контролируемых ими тонких движений.

Мозжечок играет также важную роль при выполнении быстрых, последовательных и одновременных движений [6].

## **2.2 АМРА опосредованный ВПСТ:**

На пресинаптическую мембрану (ЛВ или ПВ) воздействуют током. Происходит высвобождение нейромедиатора (глутамата) в синаптическую щель и возбуждение в результате непродолжительного увеличения проницаемости мембраны нервной клетки для ионов  $K$  и  $Na$ , которые получают возможность перемещаться ( $K$ -наружу,  $Na$ -внутри). Этот перенос приводит к изменению полярности мембраны, т.е. изменению потенциала покоя и образованию потенциала действия. Процесс деполяризации сопровождается генерацией тока. Постепенные изменения проницаемости мембраны являются условием передачи возбуждения.

Механизм передачи возбуждения:

- 1) Нервное возбуждение, распространяющееся вдоль аксона к концевым пластинкам, вызывает изменение проницаемости пресинаптической мембраны. Молекулы медиатора (глутамат), которые до этого момента хранились в синаптических пузырьках концевых пластинок нерва, высвобождаются через эту мембрану в синаптическую щель.
- 2) Молекулы медиатора (глутамат) диффундируют через синаптическую щель и, достигнув постсинаптической мембраны, взаимодействуют с находящимися в ней лиганд-зависимыми рецепторами (АМРА рецептор) - ВПСТ
- 3) Взаимодействие медиатора с рецептором увеличивает проницаемость для катионов  $Na^+$  и  $Ca^{2+}$ , что приводит к образованию в постсинаптической мембране потенциала действия [7].

## **2.3 Астроглия:**

Пространство между нервными клетками и их отростками заполнено специализированными опорными клетками, в совокупности называемыми глией. По подсчетам глиальных клеток примерно в 5-10 раз больше, чем нейронов. В отличие от нейронов глиальные клетки могут делиться.

Астроглия представлена астроцитами – это сильно ветвящиеся клетки с короткими отростками в виде шипов. Различают протоплазматические астроциты, расположенные в сером веществе и волокнистые астроциты, расположенные в белом веществе. Основная функция астроцитов – трофическая: питание нейронов, их поддержание, опора и создание гематоэнцефалического барьера [8].

Наиболее распространенный тип глиальных клеток называют астроцитами за их звездчатую форму. Считается, что астроциты очищают внеклеточные пространства от избытка медиаторов и ионов, способствуя устранению химических «помех» для взаимодействий, происходящих на поверхности нейронов. Возможно, астроциты помогают нейронам и тем, что доставляют глюкозу очень активным клеткам. Астроциты, по-видимому, играют существенную роль в передаче некоторых сигналов, важных для динамичной регуляции синаптической функции. Отдельные астроциты действительно как бы ограничивают определенные участки входных синаптических связей на поверхности нейрона. Известно, что после локального повреждения мозга астроциты участвуют в ремонте, убирая омертвевшие кусочки нейрона; эта деятельность, возможно, ограничивает распространение токсичных веществ.

Глия Бергмана - вид радиального астроцита в коре мозжечка, который находится в слое клеток Пуркинье. Глия Бергмана выражает высокую плотность переносчиков глутамата, которые ограничивают диффузию нейромедиатора глутамата при его высвобождении из синаптических терминалов. Помимо их роли в раннем развитии мозжечка, глия Бергмана также требуется для элиминации или добавления синапсов.

Отличительной особенностью астроцитов является более высокий мембранный потенциал этих клеток по сравнению с нейронами. В отличие от нейронов данный потенциал целиком определяется соотношением внеклеточного и внутриклеточного калия. При возбуждении нейрона содержание данного иона во внеклеточном пространстве увеличивается, что сопровождается снижением мембранного потенциала астроцита. Астроцит поглощает избыточный калий во внеклеточном пространстве, восстанавливая уровень данного иона и позволяя, в свою очередь, восстановить потенциал покоя нервной клетки.

Астроциты плотно охватывают синапс и играют важную роль в процессах выделения и утилизации нейромедиатора. Также взаимодействия между нейронами и нейроглией, в первую очередь астроцитарного ряда, играют ключевую роль в ходе развития головного мозга, в том числе взрослого организма. Эти влияния могут быть обусловлены активацией роста нейритов, которая была выявлена *in vitro* и *in vivo*, что связано со способностью нейроглии к выделению разнообразных факторов роста, к части из которых чувствительны нейроны и нейробласты. Данное обстоятельство позволяет предполагать роль астроцитов как в нейрогенезе, так и в процессах регенерации во взрослом состоянии, особенно при повреждениях ЦНС [9].

## **2.4 Астроглиоз:**

Благодаря своей тесной связи со всеми компонентами нервной ткани и с сосудистым руслом, астроглия одна из первых принимает на себя различные неблагоприятные воздействия, становясь реактивной. В результате происходит гипертрофия тел клеток, утолщение и удлинение их отростков, обусловленные дисрегуляцией отдельных генов, отвечающих за синтез нейрофибрилл, таких как глиальный фибриллярный кислый белок астроцитов (GFAP – glial fibrillary acidic protein), виментин и др. Данные морфологические проявления реактивного астроглиоза наблюдаются при многих видах повреждения ткани головного мозга, например, при механической травме, нейродегенеративных заболеваниях, гипоксии-ишемии и инфекционном процессе. Многими исследователями реактивные астроциты рассматриваются в качестве маркеров различного патологического процесса в ткани мозга. При этом меняются как морфология, так и функция астроцитов, что отражается на состоянии всех контактирующих с ними клеток и сосудов мозга и приводит к комплексным сложным нейропатологическим нарушениям. Возможно, наиболее известным аспектом реактивного астроглиоза является образование рубцов. Способность астроцитов образовывать шрамы (рубцы), которые ингибируют регенерацию аксонов, была признана уже более 100 лет и привела к общей негативной коннотации (связи), которая долгое время доминировала над концепциями развития реактивного астроглиоза. Тем не менее, растущий объем информации указывает на то, что реактивные астроциты оказывают ряд существенных положительных эффектов и что астроциты обладают широким спектром потенциальных и часто тонких ответов на раздражения ЦНС, из которых образование рубцов является только одним и лежит в крайнем конце с точки зрения его серьезности [10].

Реактивный астроглиоз представляет собой спектр изменений астроцитов, которые возникают в ответ на все формы и тяжести поражения ЦНС и болезней, включая тонкие нарушения; изменения, которые подвергаются реактивным астроцитам, варьируются в зависимости от характера и тяжести раздражения вдоль градуированного континуума прогрессирующих изменений молекулярной экспрессии, прогрессирующей клеточной гипертрофии и, в тяжелых случаях, пролиферации и образования рубцов; изменения астроглиоза регулируются контекстно-специфическим образом конкретными сигнальными событиями, которые могут изменять как природу, так и степень этих изменений; изменения, происходящие во время реактивного астроглиоза, могут изменять активность астроцитов как путем усиления, так и потери функций, которые могут оказывать как благоприятное, так и отрицательное воздействие на окружающие нейронные и не нейронные клетки [11].

## **2.5 Вклад ЕААТ в эксайтотоксичность при нейродегенеративных заболеваниях:**

Существует пять основных типов транспортера глутамата, или ЕААТ. Транспортеры, локализованные в астроцитах, включают ЕААТ1 и ЕААТ2. Последнее отвечает в большей мере за поглощение глутамата в центральной нервной системе. ЕААТ3 - локализованных в соматических и дендритных нейронах, но в экстра-синаптические области. ЕААТ4 находится в клетках Пуркинье мозжечка и ЕААТ5 специфичен для сетчатки. ЕААТ отвечают за быстрый, эффективный перенос глутамата из синаптической щели, где глутамат превращается в глутамин через глутаминсинтетазу. Глутамин затем переносится обратно в нейроны, где он трансформируется в глутамат и упаковывается в синаптические везикулы везикулярными глутаматными транспортерами (VGLUT) [12].

Нейродегенеративные расстройства обладают общими патологическими механизмами, такими как агрегация белка, асептическое воспаление, окислительный стресс и эксайтотоксичность. В связи с этим, существует высокая вероятность использования общих терапевтических целей для этих заболеваний [13].

Эксайтотоксичность - это установленный механизм гибели нейронов. Многие нейродегенеративные заболевания, в том числе эпилепсия, связанные с возбудимостью, имеют этот патологический механизм в своей основе. Впоследствии исследования, характеризующие эксайтотоксические механизмы этих заболеваний, были сфокусированы на изучении аспектов переносчиков глутамата и / или рецепторов. Недавние результаты указывают

на возбуждательную синаптическую дисфункцию при болезни Альцгеймера, которая походит на изменения синаптического белка, наблюдаемые в эпилептических моделях [12].

Несмотря на интенсивные исследования механизмов эксайтотоксичности, внутриклеточные механизмы, приводящие к гибели нейронов, до сих пор не полностью понятны. На данный момент считается, что поступление ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через каналы NMDA-рецепторов внутрь клетки является ключевым событием в реализации токсических эффектов глутамата. Как известно, что нарушение функционирования гомеостатических процессов регуляции эндогенно-возбуждающих аминокислот или присутствие эксайтотоксинов (аналоги глутамата) вызывает гиперактивацию рецепторов глутамата. Эти события приводят к аномально высоким уровням внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , следствием чего являются активация каталитических ферментов, образование токсичных свободных радикалов и нарушение клеточной энергии [14].

### 3 Результаты

#### 3.1 Острая фотостимуляция астроцитов:

Сделана микрофотография среза мозжечка мыши (рис.1). Наблюдается экспрессия GFAP-ChR2-mKate в глии Бергмана. Можно различить молекулярный слой, слой клеток Пуркинье и гранулярный слой.

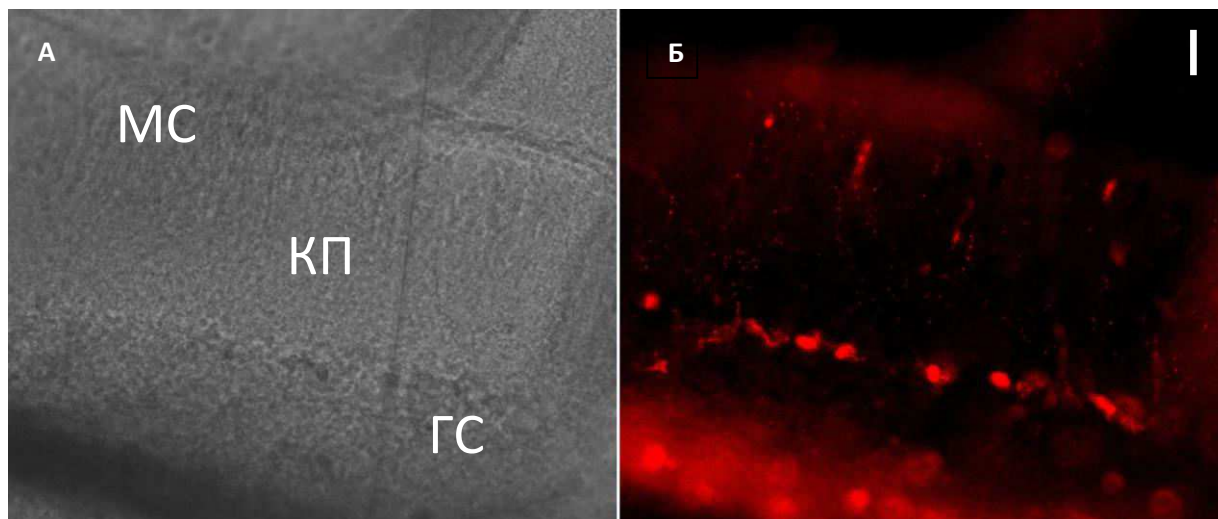


Рисунок - 1 Экспрессия GFAP-ChR2-mKate в глии Бергмана мыши.

А. Фазово-контрастное изображение – видны молекулярный, гранулярный и слой клеток Пуркинье.

Б. Нативное свечение mKate, Мерная шкала 50μм.

Был построен график усредненных данных амплитуд ПВ-ВПСТ, нормированных ко времени (рис.2). Сравнили амплитуды ВПСТ до фотостимуляции и после фотостимуляции. Видно, что амплитуда после острой фотостимуляции падает вниз.

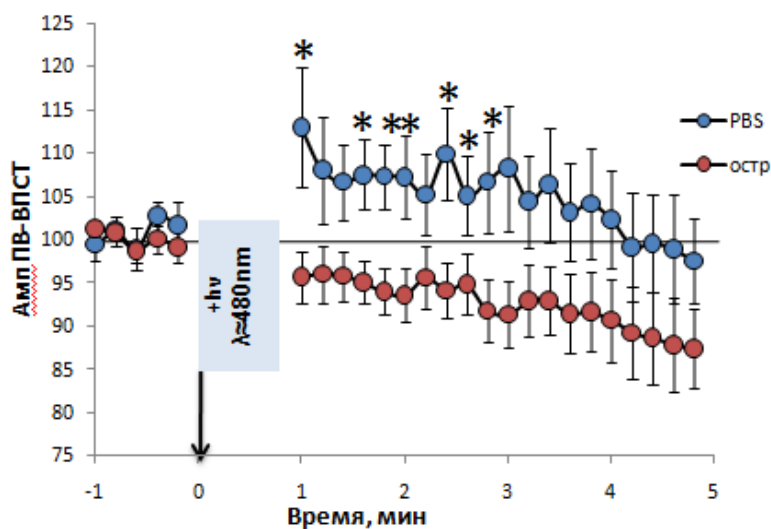


Рисунок - 2 Усредненные данные амплитуд ПВ-ВПСТ нормированные ко времени



Был построен график усредненных данных  $\tau$  спада ВПСТ, нормированных ко времени (рис.3).  $\tau$  амплитуды ВПСТ уменьшается, что говорит о том, что нейромедиатор быстро элиминируется из синаптической щели. Это происходит, более вероятно, из-за усиления обратного захвата нейромедиатора.

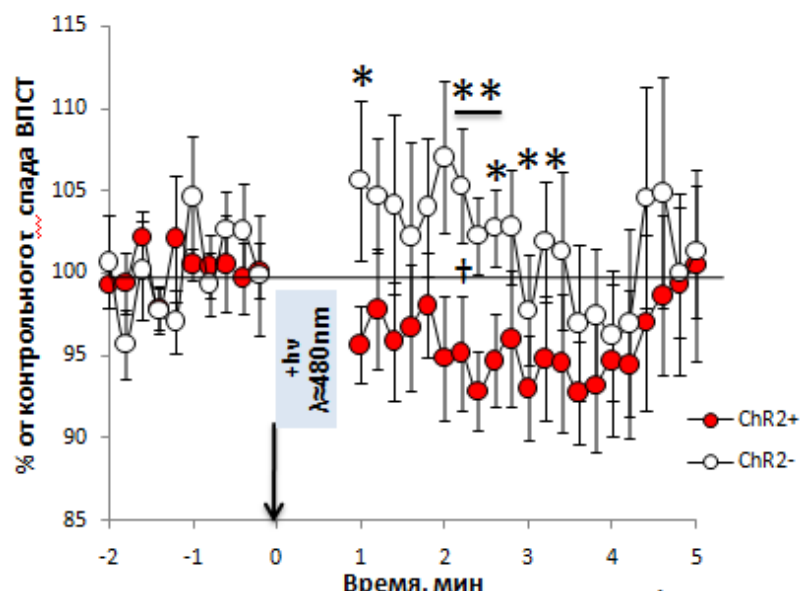


Рисунок – 3 Усредненные данные  $\tau$  спада ВПСТ нормированные ко времени

Построен график усредненных данных амплитуд ПВ-ВПСТ, нормированных ко времени при добавлении блокатора ТВОА (500nM) (рис.4) и график усредненных данных  $\tau$  спада ВПСТ, нормированных ко времени при добавлении блокатора ТВОА (рис.5). На обоих графиках при добавлении блокатора амплитуда увеличивается, что говорит об прекращении обратного захвата нейромедиатора, однако последующая фотостимуляция не влияет на транссинаптическую передачу.

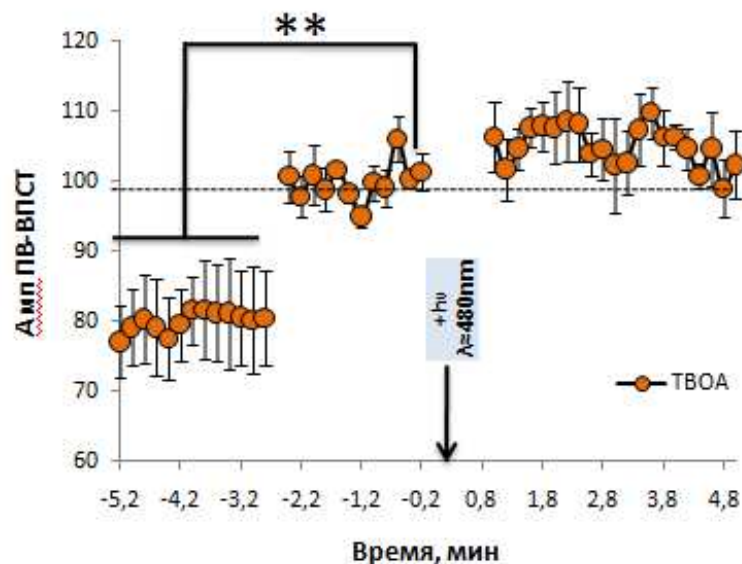


Рисунок – 4 Усредненные данные амплитуд ПВ-ВПСТ нормированные ко времени при добавлении блокатора ТВОА

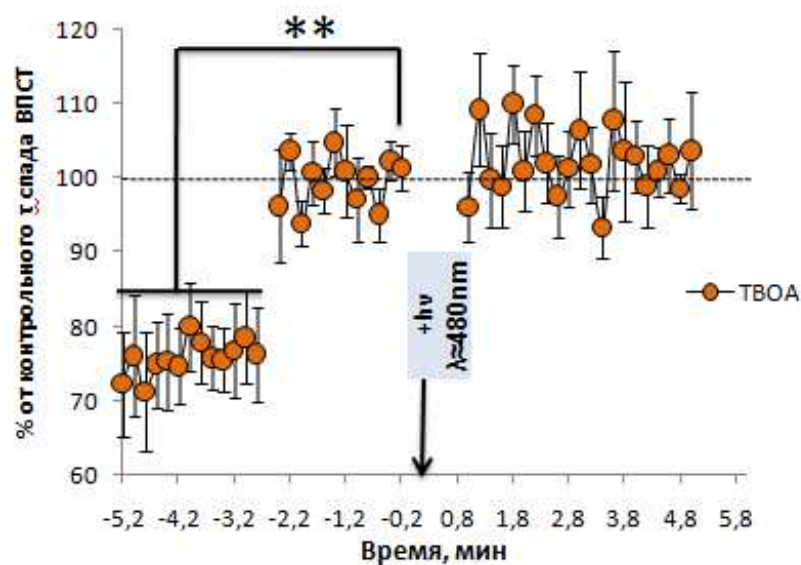


Рисунок – 5 Усредненные данные  $\tau$  спада ВПСТ нормированные ко времени при добавлении блокатора ТВОА

### 3.2 Синаптическая пластичность, индуцированная активацией NMDA рецепторов:

Был построен график усредненных данных амплитуд ПВ-ВПСТ, нормированных ко времени при активации NMDA - рецепторов (рис.6). Происходит увеличение амплитуды при активации NMDA- рецепторов. Активация NMDA- рецепторов усиливает обратный захват нейромедиатора.

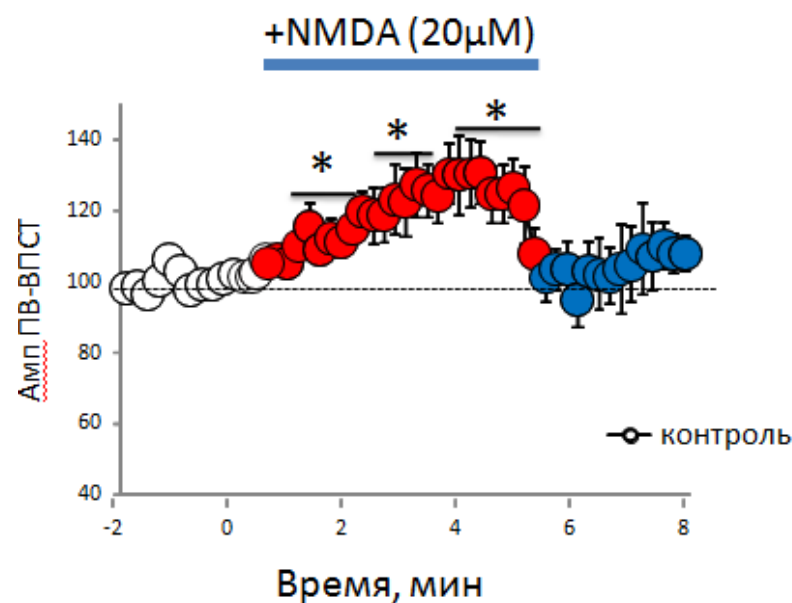


Рисунок – 6 Усредненные данные амплитуд ПВ-ВПСТ нормированные ко времени

Был построен график усредненных данных  $\tau$  спада ВПСТ, нормированных ко времени при активации NMDA - рецепторов (рис.7). Эффект от обратного захвата нейромедиатора начинается через 1-1,5 минут и длится дольше. Когда начинается промывка среза от активатора NMDA – рецепторов, эффект еще продолжается, то есть наблюдается медленная активация.

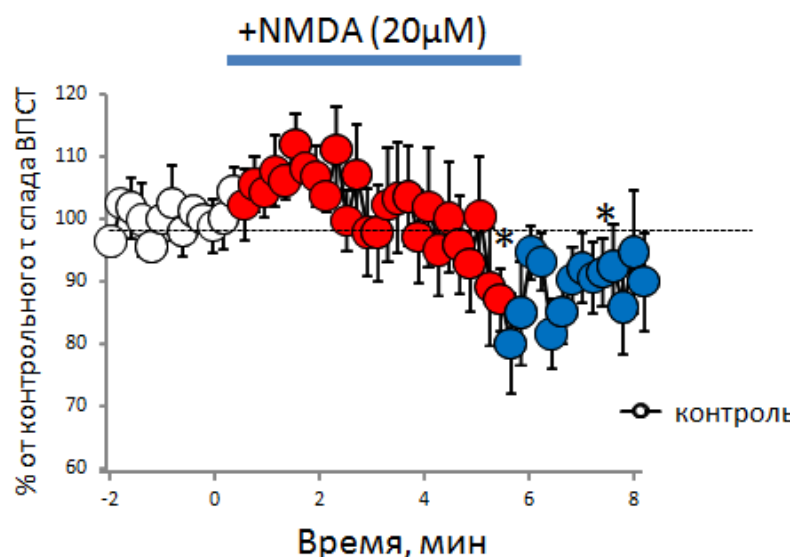


Рисунок – 7 Усредненные данные  $\tau$  спада ВПСТ нормированные ко времени

### 3.3 Острая и хроническая фотостимуляция:

Сделаны микрофотографии среза мозжечка мыши (рис.8). Наблюдается экспрессия GFAP-ChR2+-mKate после острой и хронической

фотостимуляции. После хронической фотостимуляции экспрессия больше, чем после острой фотостимуляции.

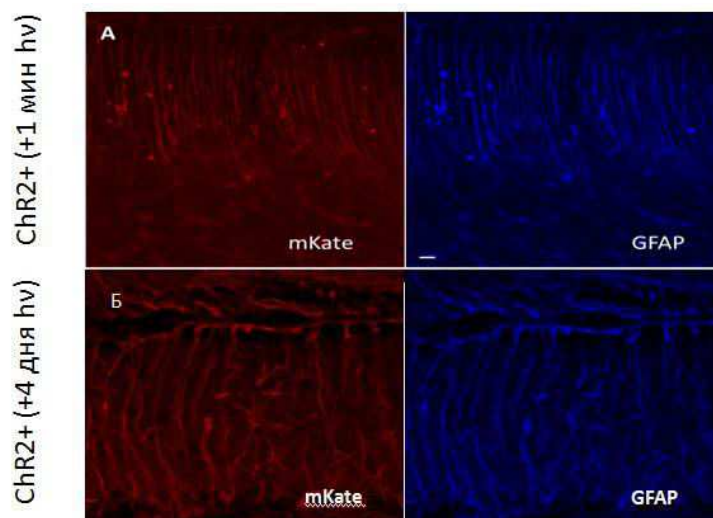


Рисунок – 8 Микрофотография среза мозжечка мыши, экспрессирующего GFAP-ChR2+-mKate после острой (А) и хронической (Б) фотостимуляции. Красный цвет – нативное свечение mKate, синий цвет – ИГХ окраска GFAP. Мерная шкала 25μм.

### 3.4 Изменение морфологии клеток после острой и хронической фотостимуляции:

Сделаны микрофотографии среза мозжечка мыши (рис.9). При хронической фотостимуляции наблюдается уменьшение размеров клеток Пуркинье, их количества и ширины молекулярного слоя.

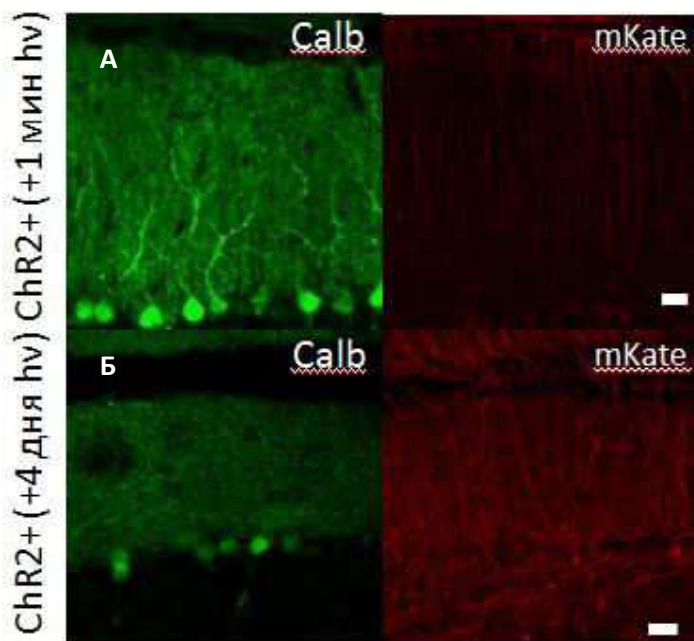


Рисунок – 9 Микрофотография среза мозжечка мыши, экспрессирующего GFAP-ChR2+-mKate после острой (А) и хронической (Б) фотостимуляции. Красный цвет – нативное свечение mKate, зеленый цвет – ИГХ окраска Calb. Мерная шкала 25μм.

### 3.5 Хроническая фотостимуляция астроцитов:

Был построен график усредненных данных амплитуд ПВ-ВПСТ, нормированных ко времени (рис.10). При хронической фотостимуляции амплитуда не изменяется.

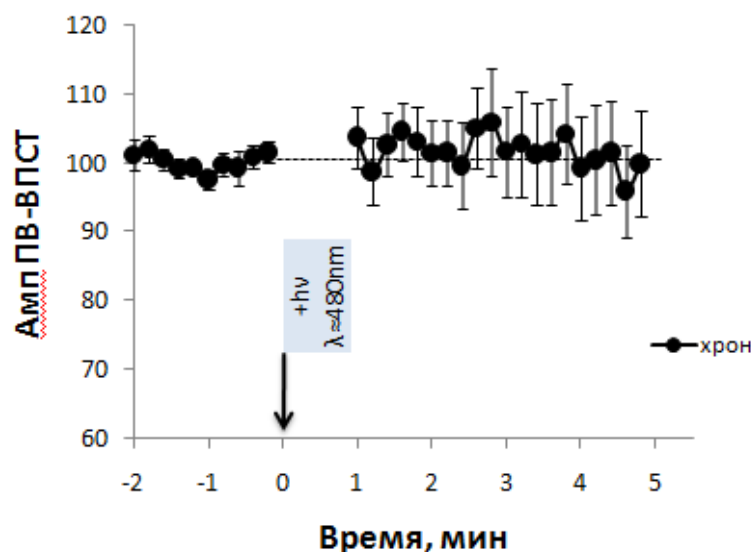


Рисунок – 10 Усредненные данные амплитуд ПВ-ВПСТ нормированные ко времени

Был построен график усредненных данных  $\tau$  спада ВПСТ, нормированных ко времени (рис.11). Наблюдается увеличение обратного захвата нейромедиатора. Время нахождения нейромедиатора в синаптической щели увеличилось.

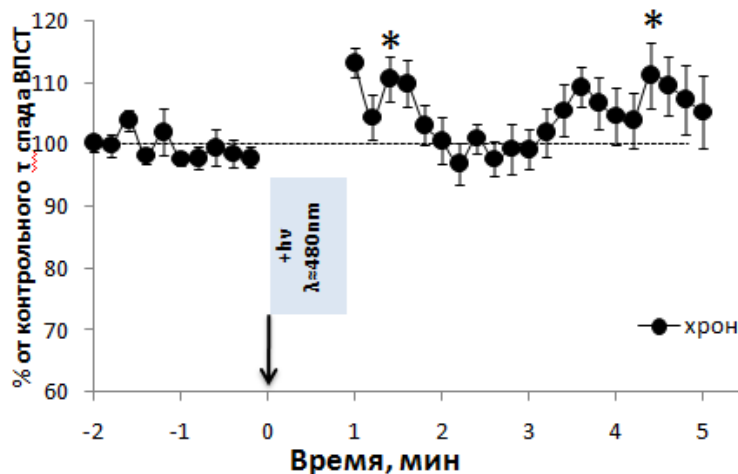


Рисунок – 11 Усредненные данные  $\tau$  спада ВПСТ нормированные ко времени

## Выводы

- 1) Оптогенетическая конструкция GFAP-ChR2-mKate селективно экспрессируется в глии Бергмана (астроцитах) мозжечка мышей *in vivo*
- 2) Острая фотостимуляция астроцитов<sup>ChR2+</sup> приводит к усилению активации обратного захвата нейромедиатора и изменению транссинаптической передачи клеток Пуркинье
- 3) Эффект при острой фотостимуляции подобен эффекту естественной активации NMDA рецепторов
- 4) Была создана модель раннего астроглиоза посредством хронической фотостимуляции астроцитов<sup>ChR2+</sup> мозжечка мышей *in vivo*
- 5) Реактивные изменения астроглии на ранней стадии патологического процесса (4 дня) приводят к нарушению морфологии и уменьшению количества нейронов в коре мозжечка
- 6) Реактивные изменения астроглии на ранней стадии патологического процесса (4 дня) приводят к нарушению обратного захвата нейромедиатора и патологическому изменению транссинаптической передачи

## Список сокращений

В данной работе применены следующие сокращения:

ChR2 – каналородопсин-2

GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок

mKate – дальне-красный флуоресцентный белок

Calb – кальбиндин

TBOA – трео-бета-бензилоксиаспартат

CPE – цитопатический эффект

AVV – аденовирусный вектор

WT CD11 – мыши дикого типа линии CD11

AMPA- рецептор – рецептор  $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты

NMDA - рецептор – N-метил-D-аспартатный рецептор

EAAT – возбуждающий аминокислотный транспортер

VGLUT – везикулярный транспортер глутамата

ВПСТ – возбуждающие постсинаптические токи

ПВ – параллельное волокно

ЛВ – лиановидное волокно

ЦНС – центральная нервная система

ИГХ – иммуногистохимия

## Список литературы

1. Custer SK, Garden GA, Gill N, Rueb U, Libby RT, Schultz C, Guyenet SJ, Deller T, Westrum LE, Sopher BL, La Spada AR. Bergmann glia expression of polyglutamine-expanded ataxin-7 produces neurodegeneration by impairing glutamate transport. *Nat Neurosci.* 2006; 9(10): 1302-1311, режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1256/>
2. Figueiredo M, Lane S, Stout RF, Jr., Liu B, Parpura V, Teschemacher AG, S. Kasparov. Comparative analysis of optogenetic actuators in cultured astrocytes. *Cell Calcium.* 2014; 56(3): 208–214, режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25109549?dopt=Abstract>
3. Llano I, Marty A, Armstrong CM, Konnerth A. Synaptic- and agonist-induced excitatory currents of Purkinje cells in rat cerebellar slices. *Journal of Physiology.* 1991; 434: 183-213, режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1673717>
4. Melina Figueiredo, Samantha Lanea, Randy F.Stout Jr., Beihui Liu, Vladimir Parpura, Anja G. Teschemacher, Sergey Kasparov. Comparative analysis of optogenetic actuators in cultured astrocytes. Режим доступа: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143416014001110>
5. Дж. Дудел, И. Рюэгг, Р. Шмидт, В. Яниг. Физиология человека : В 4-х томах. Т.1. Пер. с англ./Под ред. Р. Шмидта и Г. Тевса.- М.: Мир, 1985.- 272 с.
6. Блум Ф., Лейзерсон А., Хофстедтер Л. Мозг, разум и поведение : Пер. с англ. – М.: Мир, 1988.- 248 с.
7. Я. Мусил, О. Новакова, К. Кунц. Современная биохимия в схемах: Пер. с англ. С.М. Аваевой, А.А. Байкова.- М.: Мир, 1981-216 с.
8. Электронный ресурс, режим доступа: <https://laesus-deliro.livejournal.com/188434.html>
9. Michael V. Sofroniew. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation, режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2787735/>
10. Anna Maria Colangelo, Lilia Alberghina, Michele Papab. Astrogliosis as a therapeutic target for neurodegenerative diseases, режим доступа: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030439401400041X>
11. Milos Pekny, Marcela Pekna. ASTROCYTE REACTIVITY AND REACTIVE ASTROGLIOSIS: COSTS AND BENEFITS, *Physiol Rev* 94: 1077–1098, 2014 doi:10.1152/physrev.00041.2013, режим доступа: <http://physrev.physiology.org/content/physrev/94/4/1077.full.pdf>



12. R.K. Tannenberg, P.R. Dodd, CELL DAMAGE/EXCITOTOXICITY | Excitotoxicity and Neurodegenerative Disease, Encyclopedia of Basic Epilepsy Research, 2009, Pages 114–119, режим доступа: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123739612000692>
13. Claire J. Williams, David T. Dexter, Neuroprotective and symptomatic effects of targeting group III mGlu receptors in neurodegenerative disease, J.Neurochem.(2014) 129, 4-20, режим доступа: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jnc.12608>
14. Olloquequi J, Cornejo-Córdova E, Verdaguer E, Soriano FX, Binvignat O, Auladell C, Camins A, Excitotoxicity in the pathogenesis of neurological and psychiatric disorders: Therapeutic implications, J Psychopharmacol. 2018 Mar;32(3):265-275, режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29444621>

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования


«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологий

Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 В.А. Кратасюк

« 9 » 06 20 18 г

## ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

06.03.01 БИОЛОГИЯ

06.03.01.07 БИОФИЗИКА

Патологические изменения в синапсах клеток Пуркинье мозжечка на ранних  
стадиях астроглиоза

Научный руководитель

07.06.2018

 к.ф.-м.н. А.Н. Шуваев

Научный консультант

07.06.2018

 к.м.н. А.Н. Шуваев

Студент ББ14-01Б, 041401997

07.06.2018

 Д.А. Яковлева

Красноярск 2018